

NUCLEIC ACID PROBES**Publication number:** JP4501959T**Publication date:** 1992-04-09**Inventor:****Applicant:****Classification:****- International:** C12Q1/44; C12N15/10; C12Q1/48; C12Q1/68; G01N33/543; C12Q1/44; C12N15/10; C12Q1/48; C12Q1/68; G01N33/543; (PC1-7) C12N15/10; C12N15/11; C12Q1/44; C12Q1/48; C12Q1/68**- European:** C12N15/10D; C12Q1/68A6; C12Q1/68B; C12Q1/68B10; C12Q1/68D4; C12Q1/68D6; C12Q1/68E; G01N33/543D4**Application number:** JP19890501005 19891121**Priority number(s):** GB19880027157 19881121; GB19880027158 19881121; GB19880027159 19881121; GB19880027160 19881121; GB19880027166 19881121; GB19880027167 19881121; GB19890006643 19890322**Also published as:**

WO9006045 (A3)

WO9006045 (A2)

EP0446260 (A3)

EP0446260 (A2)

EP0446260 (A0)

more >>

Report a data error here

Abstract not available for JP4501959T

Abstract of corresponding document WO9006045

Monodisperse, superparamagnetic particles carrying a plurality of molecules of an oligonucleotide are disclosed and may be used inter alia for sequencing single stranded nucleic acids. The oligonucleotides may be covalently attached or affinity bonded to the particles either by their 3' or 5' termini. The particles have a specific gravity in the range 1.1 to 1.8 and are 1 to 10 microns in diameter. A kit for the isolation and/or processing of target nucleic acid is also disclosed.

Data supplied from the esp@cenet database - Worldwide

⑩ 日本国特許庁(JP)

⑪ 特許出願公表

⑫ 公表特許公報(A)

平4-501959

⑬ 公表 平成4年(1992)4月9日

⑭ Int. Cl.⁷ ⑮ 派別記号 ⑯ 庁内整理番号 ⑰ 審査請求 ⑱ 未請求
C 12 N 15/11 Z NA 予備審査請求 有 部門(区分) 1(1)
C 12 Q 1/44 6807-4B 来
(全 18 頁)

⑲ 発明の名称 核酸プローブ

⑳ 特 願 平2-581005

㉑ 願文提出日 平3(1991)5月21日

㉒ 出 願 平1(1989)11月21日

㉓ 願 出 願 PCT/EP89/01419

㉔ 国際公報番号 WO89/06045

㉕ 国際公報日 平2(1990)6月14日

㉖ 優先権主張 ㉗ 1988年11月21日 ㉘ イギリス(GB) ㉙ 8827157.2

㉚ 1988年11月21日 ㉛ イギリス(GB) ㉜ 8827158.0

㉝ 発 明 者 ホーンス、エリック

㉞ ノルウェー国、エヌー0283 オスロ 2、リルアケロン 9ビー

㉟ 発 明 者 コースネス、ラーズ

㊱ ノルウェー国、エヌー0375 オスロ 3、モノリットベイエン 12

㊲ 出 願 人 ダイナル・エイ・エス

㊳ ノルウェー国、エヌー0212 オスロ 2、スコーエン、ビー・オ

ー・ボックス 158

㊴ 代 理 人 弁理士 山崎 行造 外2名

㊵ 特 定 国 AT(広域特許), AU, DE(広域特許), CH, CH(広域特許), DE(広域特許), ES(広域特許), FR(広域特許), GB, GB(広域特許), IT(広域特許), JP, LU(広域特許), NL(広域特許), NO, SE(広域特許), US

最終頁に続く

① 発 明 の 要 約

- オリゴヌクレオチド分子を複製型持した、単分岐、環状複製体。
- オリゴヌクレオチドがド・アミノ基を介して粒子に共有結合している、請求の範囲第1項に記載の粒子。
- 粒子がポリアクリル酸又はポリメタクリル酸のコゲティングを有し、オリゴヌクレオチド上のド・アミノ基との反応によってド・アミド基を形成するカルボキシル基を有する、請求の範囲第2項に記載の粒子。
- オリゴヌクレオチドがド・アミノ基を介して包帯の両端に直接共有結合している、請求の範囲第1項に記載の粒子。
- オリゴヌクレオチドが、粒子上のアビジン又はストレプトアビジンに結合するド・ビオチニル基によって粒子の両端に結合している、請求の範囲第1項に記載の粒子。
- オリゴヌクレオチドが、粒子表面上のヒドロキシル基に結合する3'-ヒドロキシル基によって粒子に共有結合している、請求の範囲第1項に記載の粒子。
- 粒子が1乃至1.1の範囲内である、請求の範囲第1項乃至第7項のいずれか1項に記載の粒子。
- サイズ範囲が1乃至14クロンである、請求の範囲第1項乃至第7項のいずれか1項に記載の粒子。
- オリゴヌクレオチドが1乃至36塩基の塩基の鎖長を有している、請求の範囲第1項乃至第8項のいずれ

か1項に記載の粒子。

- オリゴヌクレオチドがポリAである、請求の範囲第1項乃至第9項のいずれか1項に記載の粒子。
- オリゴヌクレオチドが、塩基塩基のDNA又はRNA配列に特異的に結合する、請求の範囲第1項乃至第8項のいずれか1項に記載の粒子。
- オリゴヌクレオチドが、塩基塩基の塩の塩基塩基に結合する、請求の範囲第1項に記載の粒子。
- オリゴヌクレオチドが塩基塩基に対しハイブリッド形成する配列並び、粒子に結合した、相関エンドヌクレアーゼ阻害剤を含むリンカー配列を含む、請求の範囲第1項乃至第12項のいずれか1項に記載の粒子。
- 塩基塩基を不飽和し、両塩基塩基塩基中で請求の範囲第1項乃至第11項のいずれか1項に記載の粒子と接触させ、粒子上のオリゴヌクレオチドを塩基塩基塩基上のヌクレオチドに対してハイブリッド形成させる方法。
- 塩基塩基がRNAであり、粒子をその塩基塩基的に表面に結合させ塩基塩基から分離する、請求の範囲第12項に記載の方法。
- 複製粒子上に不飽和した塩基塩基に、2つのプライマーのうちの1つとしてオリゴヌクレオチドプローブを使用するポリヌクレオチド塩基塩基による塩基塩基塩基を触し、ここで両オリゴヌクレオチドプローブを複製した粒子がさらに存在しているか又はその複製部して、

特表平4-501959 (2)

増幅を可能にするのに十分な量の前記プライマーを与える、前記の範囲第13項に記載の方法。

17 一層膜状の配列装置方法であって、

(i) 配列装置するオリゴヌクレオチド (DNA又はRNA) を選択した担持基に分子を固定する工程、

(ii) (i) 分子をいくつかのアリコートに分割し、各々のアリコートに、ポリメラーゼ、混合ヌクレオチドトリホスフェート、及び1つのジデオキシヌクレオチドトリホスフェートを添加する工程であって、ここでジデオキシヌクレオチドトリホスフェートは各アリコート面に異なり、プライマーが必要であれば、プライマー又はヌクレオチド又はジデオキシヌクレオチドの少なくとも1がラベル付けされている工程か又は、

(iii) 全分子に、ポリメラーゼ、混合ヌクレオチドトリホスフェート、それぞれ異なったラベルを有するいくつかの異なるジデオキシヌクレオチドトリホスフェート、及び、必要であればプライマー、を添加する工程、

を行うことによって、それぞれ異なった長さで特定のジデオキシ塩基をともなった配列を有する、一層のラベル付けされたDNA膜を合成する工程、

(iv) ラベル付けされたDNA膜を溶解させ、大きな量にそれぞれを分離する工程、及び

(v) 配列を读取する工程、

を含む方法。

18 核酸装置を単量及び/又は製造するためのキットであって、

(a) 請求の範囲第1項に記載の装置粒子、及び以下に記載の:

(i) ポリメラーゼ

(ii) 逆転写酵素

(iii) 制限エンドヌクレアーゼ

(iv) 適当な緩衝液

(v) ジデオキシヌクレオチドであって、そのうちのいくらかがラベルを保持しているか又は保持するように適合されているもの

(vi) デオキシヌクレオチドであって、そのうちのいくらかがラベルを保持しているか又は保持するように適合されているもの

(vii) オリゴヌクレオチドであって、そのうちのいくらかがラベルを保持しているか又は保持するように適合されているもの

(viii) 順次のPCR引物・プライマー及び/又はプライマーであって、ラベル付けされていてもよいもののうちの少なくとも1つを含む、キット。

19 請求の範囲第1項に記載の装置粒子の製造方法であって、所望により前記の官能基を有するオリゴヌクレオチドを、粒子の表面上の官能基又は分子に共有又

は種別結合させる、方法。

20 オリゴヌクレオチドを、

(i) オリゴヌクレオチド上のピオチンと粒子上のアビジン又はストレプトアビジンとの反応

(ii) オリゴヌクレオチド上の5'-アミノ基と粒子上のカルボキシル又はトリメチル基との反応

(iii) ヒドロキシル又はプロテクトされたヒドロキシル基を有する粒子上でのオリゴヌクレオチドの還元化学的結合

によって結合させる、請求の範囲第1項に記載の方法。

明 細 書

摘 要

本発明は転写を促進するプローブ及びそれらを調製し使用するための方法及びキットに関する。

転写の生化学的機構において、特定の増殖物質を都合よく組み合わせることは非常に困難なプロセスであることが望ましいことが多い。順的 (linear) 転写の十分に長い配列が知られている場合、その配列に選択的にハイブリッド化し、その複製の開始及び/又は増殖に使用することができるオリゴヌクレオチドを設計することが特に有用であることが判明した。特に、そのようなプローブを不活化して、増殖装置を含む混合物との接触の際に増殖装置が選択的に不活化され、従って分離されるようにすることが慣習されている。

以前より、オリゴヌクレオチドを増殖粒子に結合させることが提案されている [例えば、アドバンスト・マグネティックス (Advanced Magnetics) の米国特許第 4,112,410号、アサヒ・コーポレーション (Asahi Corporation) の米国特許第 4,653,110号]。しかしながら、これらは決して単分散ではなく、通常、適当な平衡状態まで洗脱され、その後、オリゴヌクレオチドを含む明瞭の塩基分画の範囲への結合を可能にする官能基をもたず無関係に洗脱された増殖装置に留っていた。さらに、このような増殖粒子は特に自発的に洗脱された反転写では増殖性がなく、実用上好ましくないことが証明されている。

発表号4-501953 (3)

特に、磁場によって制御された磁性粒子はしばしば磁気的異方性に不適切に形成し、かなりの割合が結合した磁性分子とともにスピンコイル中に捕縛し、磁場よりも少ない磁場分子の捕縛しかけられないことが判明している。本発明は、単分散超常磁性 (ultrafine superparamagnetic) 粒子が磁場によって磁化された磁性粒子よりも大幅に清浄度が高いということの発見に基づくものである。

本発明に従って、本発明者は、磁性のオリゴヌクレオチドの分子を用いた単分散超常磁性粒子を開発する。

本発明の粒子は、目的一度磁化状態に對するハイブリッド形成用のプローブとして使用でき、またターゲットオリゴヌクレオチドの迅速配列決定を可能にすることにも利用される。

オリゴヌクレオチドは一重鎖DNAであるのが好ましいが、それはこれがRNAと一重鎖DNAの両方に対してハイブリッド形成し、かつRNAよりもかなり安定だからである。このようなRNAには、オリゴdT (これは宿主細胞からのRNA上に容易に経路するポリ(A)) 「テール(tail)」とハイブリッド形成する) 及び標的RNA及びそのDNA分子中の特定の配列とハイブリッド形成する特定のRNA配列が含まれ、又は標的配列と近接するDNA分子でもよい。本プローブは、オリゴdT又は特定のRNA配列でよい一重鎖DNA配列が磁性粒子に直接結合したものから成ることができるが、

DNAの二重鎖部分を介して磁性粒子に結合していてもよい。本明細書中で使用される「オリゴヌクレオチド」という用語は、合成及び自然のあるゆる長さのDNA及びRNA配列を包含する。

オリゴヌクレオチドの長さは15乃至100塩基 (bp) が好ましく、15乃至30塩基があるに好ましい。オリゴ (67) 配列と、特定の用途では、制御配列 (低く単数又は複数) とを含むプローブオリゴヌクレオチドは、市販のDNA合成装置、例えばアプライド・バイオシステムズ・インク (Applied Biosystems, Inc.) (CA 94044、フォース・クエンチャー・ランカーセンセーグタイプ、1991) 型の装置、のいずれかを利用して行うことによって最も容易に製造することができる。

本発明によるプローブは、一般に、磁気的吸着の原理とその他の化学的及び/又は生物学的技術による操作において使用される。

磁性粒子を使用することによるいくつかの利点は明らかに存在している。磁性粒子は、磁気的吸着を介して固相、例えば磁気ワークス、に添加され、洗滌され、そして磁気的リセプトフル (isoprecipitation) の一方の側に引き寄せられ、液体はその必要ない成分とともに除去でき、そして、結合したRNAを有する磁性粒子は純粋溶液中に再分散できる。洗浄工程は再び磁場に放回し直すことができる。磁気的吸着を得る全工程を15分以内で行うことができる。

別の利点は、磁性粒子を使用して行われるハイブリッド形成又はその後のいかなるプロセスも、開閉を介して粒子を磁気的に結合させ、粒子上の物質についてか又は上澄液中の物質に結合材料 (litter) を分離することによって、磁場時にモニタリングすることが容易にできるということである。

磁気的吸着を利用することによる粒子の分離は、本発明は吸着性を劣化させる可能性のある界面力を生じる遠心分離のような従来の分離技術よりもはるかに優れている。

磁性粒子は単分散でありかつ超常磁性であり、これらの特徴は、粒子が含まれる反応の速度論に大きく寄与する。粒子に結合されたプローブが種々の反応において溶液中で高濃度になるまで速く結合するかのようによく反応することは、本発明の驚くべき特徴である。従って、例えば、磁性粒子を用いる磁気的吸着から得られたRNAの全長は約15分以内に行うことができるが、これに代りフリンター・カラム (flint/cellulose) を使用すると数時間である。単分散粒子、即ち、ほぼ同じサイズを有する粒子、を使用することによって、反応速度及びその後のパターナーは特に高いである。超常磁性粒子 (即ち、永久磁性を維持するために必要な磁区 (magnetic) の大きさよりも小さい磁性粒子のサブ粒子を含む粒子) を使用することによって、反応中の粒子の凝集 (aggregation or clumping) を防ぐことができ、従って、

これもまた均一かつ速い反応速度を確保に寄与する。従って、粒子は磁場をかけることによって範囲上に均一な速度で容易に凝集させることができるが、例えば磁気的吸着によって、その後の処理用に容易に再分散させることができる。反応の開始及び最速きの所一歩は特に自動化への道をもたらし、このことは、工業的製造及び又は高価なプロセスにおいて必要な多くの磁気的吸着の必要箇所である。最小限の人間の介入しかともならない迅速な操作によって、反応及び分離が完全な信頼性をもって行えるということは最も重要な事である。

本発明において使用するのに好ましい磁性粒子は、欧州特許第 310133E 号 [シネプレックス (Synplex)] に従って製造される単分散超常磁性粒子であり、この引開の開示は本明細書中に含まれる。これらの粒子の中には、個が非常に均一に分散しており、磁場に對する非常に高い応答性をもち、これによって全ての粒子が同じ速度で移動するので、高濃度のある溶液、特にオートメーションを駆動する際に重要である。さらに、他の磁性粒子のある量が各粒子に均一に付着しているため、これを、以下で説明する装置の粒子の比重を可能にする比較的近い濃度で調整することができる。従来の、規則性の劣った生成物においては、小粒子は、磁場がかけられた時にブラウン力 (Brownian force) を打ち出すに十分な速度を失うか、あるいはその重量の比重はより大きな粒子へ中置ましくないので均一な分布を生じさせる。機つきの自動化を

特許第4-501359(4)

れた装置は、粒子を反応領域内に保持し、一方反応は流れていかせると、装置を使用している。この様な装置で使用するためには、反応粒子の均一な密度及び物理的性質は必須のものである。

本明細書中に於いて使用される「単分散」という用語は、5%未満の重量標準偏差を有するサイズ分布を意味するものである。

1.1乃至1.5の比を有する粒子を使用するのが好ましく、1.1乃至1.5の比が特に好ましい。本発明に於いて使用される単分散粒子において、比重はここでも特に均一であり、均一で再現可能な物理的物性をもたらす。

単分散粒子は、少なくとも1ミクロン、好ましくは少なくとも2ミクロンの直径の球形粒子であるのが通常であり、10ミクロン以下、好ましくは5ミクロン以下、例えば約3ミクロンの直径であるのが好ましい。径が小さくしなければなるほど溶解は速くなり、反応時間が反応時に低減するほど速くなることもあり、従って反応の進行の必要性を省ける。しかしながら、従来技術で使用されているような、ずっと小さい直径の球形粒子を含む平均直径が1.1乃至1.5ミクロンの粒子は、溶化への応答において遅延があるようには行動しない。

グロブの粒子への結合は、直接の化学結合並びにストレープアビジン (streptavidin) / ビオチン (biotin) 結合などによる能力の組合でよい。

細孔を有した表面に特定の官能基を導入するためには、例のモノマーを細孔中及び表面で重合させる。好ましい種類の粒子の重合、装置は、 $(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n$ 化合物を用いてポリマー基に結合している官能基を有する。その物の好ましい粒子は、メタクリル酸の重合によって得られた官能基を有する。

従って、例えば、粒子中に初めて存在している官能基を、米国特許第 4,512,617 号に記載されているようにジエポキシドと反応させ、その後メタクリル酸と反応させて単分散性重合体を得てもよい。メタクリル酸との増殖反応は、以下で反応する官能基のような、水溶性カルボキシル基を有するポリマー基を造る。同様に、官能基、官能基及び官能基のようなジエポキシドとの反応の上記官能基をジアミンと反応させることによってアミノ基を導入することができ、一方官能基及び官能基のように、アミノグリセロールのようなヒドロキシルアミンとの反応はヒドロキシル基を導入する。

ダイナビーズ (Dynabeads) 445 (直径 4.5ミクロン) (これはノルウェー、オスロのダイナビーズ社から得られる) は、単分散性エポキシドで被覆されており、エポキシ基とヒドロキシル基の重合性をもたらし。しかしながら、水との接触でエポキシ基をヒドロキシル基に転換する。

ダイナビーズ 445 (直径 3.3ミクロン) は、ストレープアビジンと反応する能力によってストレープアビジン (streptavidin) に結合されているヒドロキシル基を有

するグロブの組合用は、官能基は、ヒドロキシル、カルボキシル、アルデヒド、又はアミノ基を呈示してもよい。一般に、これらは、被覆されていない単分散性重合体粒子を処理して、上述の官能基のうちの一つを有するポリマーの表面被覆を施すことによって得られ、ポリマーの例は、ヒドロキシル基を与えるためのポリグリコールをともなうポリグリセリン、ヒドロキシル基を与えるためのセルロース誘導体、カルボキシル基を与えるためのアクリル酸又はメタクリル酸のポリマー又はコポリマー、アミノ基を与えるためのアミノアルキルポリマーなどである。米国特許第 4,512,617 号は、このような装置製造をたぐとん紹介している。

本発明において使用するのに好ましい装置された粒子は、米国特許第 4,512,617 号、第 4,512,618 号、並びに第 4,512,619 号に於いて粒子の性質によって製造され、これらの引用の開示は本明細書中に含まれる。従って、例えば、スチレン-ジビニルベンゼンから製造され、1.15ミクロンの直径を有するマクロ球状 (macro-spherical) 多孔質高分子粒子は、100%で製造され細孔の表面に官能基が導入された。その後、粒子は、 Fe^{3+} の水溶液中に分散された。 Fe^{3+} は官能基によって酸化され、これは細孔の内側に不溶性の鉄オキシ-ヒドロキシ化合物を析出させる。同様に、鉄に、酸化還元剤の選択的競争として、細孔粒子に於いて存在する。官能基は Fe^{3+} との反応によって官能基で還元される。

するポリスチレンビーズである。

上記のタイプの官能化された装置を使用することによって、DNA及び/又はRNAの非特異的結合が非常に低くなり、特に、カルボキシル化ビーズの場合にそうであることを本発明者らは発見した。

ハイブリッド形成したDNAとRNAを共にcDNA合成に適用する場合、グロブと23リンカーはカルボキシル基を介して懸架粒子に結合しているのが好ましく、このDNAは同時に5'-末端アミノ基が喪失され、これはカルボキシイミドカップリング剤を使用してカルボキシルとアミド結合を形成させることができる。DNAの3'-結合は、5'-アミノDNAと反応するように5'で修飾されたヒドロキシル末端基を介して行うことである。

ポリグスタレオチンDNAの3'-結合もまた化学的結合によって行うことができる。ここでもまた単分散性粒子の非常に均一な性質は、ジーン・アセンブラー (Gene Assembler) [ファーマシア (Pharmacia) 社] のような自動化された合成装置中での合成に際しての均一な反応速度をもたらす。懸架粒子は、ためにヒドロキシル基又はプロナトされたヒドロキシル基を供給されることを必要とする。ダイナビーズ 445 のダイナビーズ 445 はこの目的によく適合する。しかしながら、必要な場合には、カルボキシルのようなその他の官能基を使用してヒドロキシル基を有するリンカー又は3'-結合基を

特表平4-501959 (B)

[オクレイック・アシッド・ハイブリダイゼーション (Okeley Acid Hybridization)、ビー・ディー・ヘイムズ (B. D. Hayes) 及びユス・ジャー・ヒガンズ (S. J. Higgins)、アイアールエル・プレス (I. R. Press)、1983、を参照のこと]。

プローブからのmRNAの抽出は、通常は簡単で、例えば、J. Mol. Biol. 中において15℃で無処理することによって行うことができる。

本発明の方法は、特定のmRNAフラクション又はさらに特定のmRNA分子の分離の前の予備精製工程としてのように、細胞粗解液からの全てのmRNA物質の分離に適用することができる。この目的のために、プローブはオリゴdT、即ち、例えば12乃至100塩基 (knt)、即ち、例えば15乃至30塩基のような、比較的短いデオキシ核糖ヌクレオチドの鎖、であるのが好ましい。このような鎖は、デオキシ核糖の酵素分解に耐え、より短い鎖に対しては、糖鎖化されたDNA合成又は発見的重合によって、容易にかつ安価に調製することができる。

オリゴdTは決り又は重合割合によって粒子に選択的に結合できる。この場合、ハイブリッド化されたmRNAはその後加熱によって溶液中に溶解し、所望の濃度溶液中所望の濃度の特定のmRNAの割合を与える。

この重合過程の特定の例点は、もしそれが5'-末端

の末端はストリンジェント (stringent) 条件下で、温度を上昇させるか又はハイブリッド化中に使用するのよりも強い塩濃度、例えば、0.5Mの塩化ナトリウム又は酢酸溶液 (acetic acid solution)、を使用することによって行ってもよい。

ストリンジェンシー (stringency) は通常プローブの長さと、GC含有率によって計算される。プローブオリゴヌクレオチドと標的mRNAの間の相関 (homology) が不正確である場合、洗淨は比較的小さいストリンジェント条件下で行うべきである。一般に、洗淨は、2番 (step) の温度 (T₂) より12℃低い温度で行われる。大体的には、上述のマニアスの文献の 121-123頁からの以下の関係に従って簡便に計算できる。

$$(1) T_2 = 55.1 + 0.41 (G + C) - 650/L$$

もしヌクレオチド中のプローブの平均長さに等しい。

(2) この2番mRNAのT₂は、既って組み合わされた塩基対の数が1%増加することによって下がる。

$$(3) (T_2)_2 - (T_2)_1 = 16.5 \log_{10} (n_2/n_1)$$

ここで、n₁及びn₂は2つの相関のイオン強度である。

小さいオリゴヌクレオチドに対しては、この数値は以下のようにして単位で近似できる。

$$T_2 = 2 \times (\text{A+T 塩基の数}) + 4 \times (\text{G+C 塩基の数})$$

ハイブリッド化反応は、1M塩化ナトリウム溶液又は本技術分野で公知の任意の溶液中で行うのが好ましい。

もしして粒子に結合する場合、DNAプローブの3'-末端はまた逆転写用のプライマーとして作用して一度逆転写 (reverse transcriptase) DNA (ss cDNA) を形成することが可能であり、ss cDNAはその後、所望により、本願出願人の米国特許第 4,111,151 号及び第 4,111,152 号に所記する本願と同日付の国際出願 (その内容は参考として本明細書中に組み入れられる) に従って、単離したmRNAに相補的な2重鎖cDNA (ds cDNA) を製造するのに使用できる。1つ以上の制限エンドヌクレアーゼ断片を有するリソナーを介してのDNAプローブの3'-末端の結合によって、このプローブ、合成されたds cDNAは、物理的切断によって粒子から遊離させることができ、粒子は選択的に分離される。

しかしながら、本発明の別の実施態様によれば、プローブは標的mRNA分子に対して特異的である。

遺伝粒子にカップリングされた特異的DNAプローブの使用は、プローブとハイブリッド形成する特定の配列を有するmRNA分子の濃度 (level) を単離する際に特に価値がある。従って、例えば、免疫グロブリンに結合するmRNAのコーディングは、強い鎖と弱い鎖の一定の範囲からのDNAプローブを使用して調製する細胞エキスを単離できる。選択的に分析する既知の研究において、遺伝子の保留された配列 (conserved regions) に対応するプローブを使用して一定の面

された遺伝子から保留されたmRNAを単離することができる。

2. 一重鎖DNAの分析

本発明による遺伝オリゴヌクレオチドは、mRNAの場合と同質的に同じ方法で、ss cDNAを単離するのに使用できる。細胞粗解液のように、DNAがサンプル中に二重鎖の形態で存在する場合、解離工程が初期に必要である。これについては、後述の例で説明する。

オリゴdTプローブを保持する本発明の遺伝粒子は、特定の基的複製配列 (specific target sequence) の分離に有利に使用することができる。基的複製及びさらに、例えば、10-15 kDaのオリゴdTの公知の配列に特異的なDNA配列を含むプローブを合成できる。プローブは標的濃度とハイブリッド形成し、そしてラベル付けされたプローブは標的の鎖の配列とハイブリッド形成する。その後、この三成分複合体を分離するためにオリゴdTを塩析している遺伝粒子を使用でき、標的鎖は、オリゴdTとオリゴdTの間の水素結合のみが壊れるようである。オリゴdTとオリゴdTの間の比較的強い結合は、例えば、加熱又はグアニンシチオンキネート阻害剤による選択によって、容易に可逆的になる。従って、ハイブリッド化溶液からの遺伝粒子の除去及び洗淨の後、三成分複合体を粒子から抽出させることができ、さらに選択的

に複製する大抵は、2面以上のマイクロの複製処理を行うことができる。この複製は、透視やラベルでラベル付けされた複製原稿の形状、複製的分派システムにおける「ノイズ(noise)」の共通の部、を捨ててで得に有効である。

6. 一般例のRNAはDNAの塩基配列決定法

DNAの塩基配列決定には2つの主要な方法、即ち、Maxam-Gilbert法とSangerジデオキシ法がある。Maxam-Gilbert法は、1本の短いDNAでラベル付けされているDNAを用いて出題する。ラベル付けされたDNAは、その後、4つのメタクロホルムで塩基的に切断される。条件は、平均して約1本当たり1つの切断が起こるように選択される。与えられた塩基での切断用の反応混合物中において、各々の切断された塩基は、末端からその塩基の位置の1つまで伸びる塩基性断片を生成し、そのような断片は塩基の全ての位置に対して進む。これらの断片は、例えば、240塩基ゲルから成るオートラジオグラムによって分離される。切断された塩基基までの距離を測定することによって、全体の配列を決定する。Maxam-Gilbert法は100塩基以上の配列を決定するのに使用できる。

DNA塩基配列決定用の15341ジデオキシ法は、断片的複製の制御された複製に依存する。DNAポリメラーゼは一般にDNAの特定配列のコピーに使用され

発表号4-501859 (7)

る。この合成は、塩基的断片によってプライムされる(primed)。4種のデオキシリボトリホスフェートに加えて、後置(incubation)混合物は、それらのうちの1つ、3'-ジデオキシ糖断片(3'-dideoxynucleoside)を含む。このジデオキシ糖断片又はデオキシリボトリホスフェート中のうちのいずれか1つがラベル付けされる。この混合物は次のホスホジエステル結合を形成するために必要な3'-ヒドロキシ基を欠いているので、この混合物の組み込みは新しい断片のみに成長するのを妨害する。従って、ジデオキシ糖断片が3'末端にある様々な長さの断片が形成される。このような塩基形成-停止(3'-terminal-terminating)断片群の4つの組(各々のジデオキシ糖断片に対して1つずつ)をゲル上で電気泳動させて、4つのレーン(オートラジオグラムからDNAの塩基配列を読む。最近、ジデオキシ糖の断片が観察され、これは塩基塩基断片のオリゴヌクレオチドプライマー、即ち、4つの塩基形成-停止混合物の各々の中で別々に着色されたもの、への結合を含む。これらの混合物は混合して、一冊に電気泳動させる。それらが検出器を通過するとき、それらの蛍光によって、DNAの分離したバンドが検出される。この方法では100塩基までの配列を決定することができるが、一般に、約150塩基のようなより短い配列が好ましい。

DNAのかなり長い配列は、この方法によって塩基

配列の決定をする前に、より小さい断片(150-350塩基)に切断しなければならない。通常、配列データを正確に得るためには、断片的に異なる長さの断片が必要である。断片的に異なる長さの断片の形成はDNA配列の決定におけるもう一つの工程を作り出す。

通常使用される塩基配列決定法の1つは、DNA配列クローニング法で形成するが、これは一般にDNA鎖を与える。配列が100塩基よりも長い場合、通常の方法は、初めの部分の塩基配列を決定し、このようにして得られた情報を使用して、次の100塩基部分のプライマーを合成し、そしてこの手順をDNA鎖全体の塩基配列が決定されるまで繰り返す。しかしながら、テンプレートDNAを包含するDNA物質がゲル上に浸透されなければならないので、各回毎にクローニング法ファージの新しいサンプルを使用する必要がある。塩基の大きな断片のサブ断片を形成する必要がある。塩基の塩基配列決定法に対する要領がある。また、簡単、迅速、かつ自動化につながるような方法に対する要領もある。

本発明のさらに別の面によれば、一般塩基の配列決定方法であって、

- (1) 配列決定すべきオリゴヌクレオチド(DNA又はRNA)を溶解する塩基性塩分緩衝液を添加する工程、
- (2) (1)の塩分を4つのアリコートに分割し、各々のア

リコートに、ポリメラーゼ、混合ヌクレオシドトリホスフェート、及び1つのジデオキシヌクレオシドトリホスフェートを添加する工程であって、ここでジデオキシヌクレオシドトリホスフェートは各アリコート毎に異なり、プライマーが必要であれば、プライマー又はヌクレオシド又はジデオキシヌクレオシドの少なくとも1つがラベル付けされている工程又は、

(a) 各アリコートに、ポリメラーゼ、混合ヌクレオシドトリホスフェート、それぞれ異なるラベルを有する1つの異なるジデオキシヌクレオシドトリホスフェート、及び、必要であればプライマー、を添加する工程、

を行うことによって、それぞれ異なる断片と特定のジデオキシ塩基をもった断片を生成する、一冊のラベル付けされたDNA鎖を合成する工程、

(c) ラベル付けされたDNA鎖を溶解させ、大きな断片にそれらを分割する工程、及び

(d) 配列を決定する工程、

を含む方法が提供される。

配列決定される一般塩基はオリゴヌクレオチドであること、及び工程(a)が本発明による割合されたオリゴヌクレオチドを有する塩基断片の形成を含んでいることに注目すべきである。配列決定される一般塩基断片がRNAである場合は、ポリメラーゼは

特准平4-501959 (B)

ポリメラーゼでよく、 β -DNである場合は、
ポリメラーゼは β -DNポリメラーゼか又は逆転写酵素
であることが認められるであろう。

サイズ分別時に断片の同定を容易にするために、ブライマー断片は、それに適合したラベルを有してもよい、あるいはアタラシロシトリアフェート又はトリデオキシシロシ塩基、例えば、置換塩基でラベル付けられてもよい。塩基塩子に結合したタンパク質領域とはDNA断片の両方を塩基塩子とともに断片から塩基的に分離し、e DNA断片を配列決定増殖剤中に遊離させることによって、塩基のラベルを原から解離できることは、本開明の配列決定法の開蒙の1つである。従来の配列決定方法においては、塩基ラベルが配列決定ゲルからの僅(100pg)を含有していた。

本発明による特に可能な方法の1つは、初めに、配列決定するDNAのクローンをクローニングベクター中で増殖させて応用抗血清のDNAを十分な量準備する。あらゆる種類のクローニングベクターを使用できる。その後、DNAはベクター中の適切な部位で切断され、簡便にベクターの短台部分（これは既に配列決定されている）を通して宿主細胞への融合に適する点を提示する。

二重鎖DNA配列がβ-デオキシリボ糖を介して核子に結合している場合、それを覆包させて、配列決

用するDNAを含め、融解プライマー反応を介して遺伝子に結合している一塩鎖を調製することができる。

上記のものに対して相補的なプライマーはアヌール (Anuol) であり、例えば、放射性ヌクレオチド及びボツモノイグプライマー部分を加えアヌーリングすることによってラベル付け可能。その例、として、標識を添付しようとする、サイズ分別を含む配列決定が行われる。配列決定は、通常、おおよそ15%の塩基に對して行われ、正確なサイズ分別を可能にする。これは、ジデオキシヌクレオチドのノーマルヌクレオチドに對する比率を調節することによって達成される。合成されたcDNA断片は、液相上のDNAに害を与えることなく、塩基によって除示である。その後、配列情報は、配列決定されるべき次の一連の塩基塩基の短縮プライマーを設計するために利用される。このようにして、非常に短いDNA断片（例えば、100塩基）が、部分塩基に、従来の方法に見られる塩基の両面に標識することなく、塩基配列決定できる。

・クロームエポキシー樹脂に組み込まれているプライマー配列は、簡便には、従来の113番配列決定法において使用されている、いわゆる、「ユニバーサルプライマー (universal primer)」である。106番塩基を写す全てのベクターはこのプライマーを有しており、これは、5'-GTGAGCGACGACGCGT-3'の配列を有している。本発明の塩基配列決定法は塩基の写知を要すること

がでる。

A. 配列決定されるDNA酸は、ジデオキシ化され、
 ストレプトアビジンを含む男性粒子に結合しても
 よい。希望により、二重鎖DNAをこのようにして
 結合させ、その後、高塩して配列決定に必要な高
 塩を与えるもよい。これは、上段液から分離される
 べき分離した鎖が不活化された液で汚染されないよ
 うにでき、このもう一つの鎖は明確に配列決定して
 配列情報の照査を与えることができることは注目す
 べきである。プライマーはDNAの3'末端、標的、標的で、
 上流のデオキシ及びジデオキシ塩基の約300塩基ま
 で、ハイブリッド形成し、次の部分を配列決定する
 ために上述したようにさらにプライマーが変換とされ
 る。

B. 配列決定されるべきDNA鎖は、磁性粒子に埋め込まれているリンカーにハイブリッド形成でき、このリンカーは一種類のDNAのループの形態であり、ここで、3'末端が3'-末端に近い領域でハイブリッド形成し、DNA鎖の3'末端領域に対応する磁珠結合位点に3'末端を導く。このようなループは、アミノ又はヒスチン基を介して磁珠表面に結合することができ、これらの基は磁石に相対されればカルボキシル又はストレープアミン基とそれと反応することになる。DNA鎖は、3'-末端で磁石と結合し、その後、ループの3'-末端に配位して両方の

合を与えてもよい。ループによって与えられたものに
対応する格差格差関数を算出する二重ループは、こ
のようにして結晶することができ、2つめのループはそ
の後置法によって終結でき、318 箇所までの第1の
部分に規則的配列するためのブライマーとしてのル
ープの3/4 収束を確保することができる。

C. 磁性粒子は、DNAのある部分に対しハイブリッド形成するプローブを配列することができ、このプローブは第1章部分の配列決定をするためのプライマーとして役立つ。プローブに対してハイブリッド形成するDNA配列は、配列決定されるDNAに封じられているのが好ましい。これに、後者のDNAが追加の定座DNA配列とともにベクターから切断される場合、結果に都合がよいことである。核酸がmRNAの場合、プローブは、食品原料mRNAのポリヌクレオチド鎖(11)に対しハイブリッド形成する5'-末端ヌクレオチド配列でよい。或いは、例えば、mRNAの5'-末端配列が既に知られている場合、プローブは、mRNAの3'末端配列に対しハイブリッド形成する特定のDNA配列でよい。

陽酸化剤がブライマーにラベルを適用することを要する場合、ブライマーとしても機能するグループは、合成されたNAN鎖をラベルとともに粒子から切り取れるように、適当な保護を有していなければならぬ。この意味では方法2)及び3)の

特表平4-501959 (9)

両方に適用される。しかしながら、グロブに両端結合させて合成されたDNA鎖とともに容易に分離する、分離可能なプライマーを単に使用することもできる。

4. ポリメラーゼ連鎖反応(PCR)による鎖の増幅
鎖的DNA分子は、細胞溶解液又はその他の原料中に極めて少量でしか存在しないことが多く、配列決定の前にそのようなDNAを組織的に増幅(amplify)するために、ポリメラーゼ連鎖反応(PCR)法を使用している。鎖的DNAを増幅させるためにはタコウニグ工程を使用するよりもむしろPCR法が採用される。PCR法においては、鎖的DNAの公知の配列に特異的な一対の塩基プライマーが選択され、ポリメラーゼの存在下に、各プライマーが鎖的DNAテンプレートの延長まで伸びるDNA配列を生成するように、一方はコーディング鎖の3'末端又はその付近ハイブリッド形成し、他方は非コーディング鎖の3'末端又はその付近でハイブリッド形成する。このようにして形成されたDNAがその鎖、鎖鎖には鎖鎖での増幅による、断片化原因によるされる場合、新たに形成した一連鎖DNA配列は混合液中に存在する遊離のプライマーに対しハイブリッド形成し、通常アニーリングに達する範囲まで温度を下げた後、ポリメラーゼの存在下にさらにDNA鎖が合成されるが、今度は2つのプライマーの両端間しか伸びない。ポリメラーゼは、断片間

工場で使用される高価な中で生き延びることができるのが好ましく、超する特殊なポリメラーゼ、すなわち、Fig. 1が最近利用できるようになった。遊離の2つのプライマー及びDNA合成に必要な遊離のヌクレオチドが液体中で維持される場合、別々の鎖が合成され、分離され、プライマーまでアニーリングされ、新しい鎖が合成され、これらがただ単に上記の工程に対する最適化の際で温度を上下させることによって行われる、従来の高アクセスを行うことができる。この方法においては、オリジナル鎖的DNAの増幅が断片間鎖であり、断片の数百万倍の増幅が比較的短い時間で行うことができることが判明した。

しかしながら、プライマーのその鎖のDNAへの非特異的結合と、それにより鎖的DNAに加えてその他のDNAが増幅されることによって、この方法は必ずしも十分に選択的ではない。プライマーの非特異的結合による、このサンプルDNAのランダムな鎖鎖の増幅は、鎖的DNAからのシグナルに比較してバックグラウンドのノイズを増加させる。多くの場合、このバックグラウンドノイズのレベルの増大は、この方法の有用性に大きく影響を与える。

分子タコウニグに関連して、このプライマーの非特異的結合の問題が、第1の鎖のプライマー中に入れ子になっている第2の鎖のプライマーを使用することによって解決できると提案されている。

4つの鎖鎖のプライマー化を要求することによって非特異的結合の大幅な低減化が達成される【ホリス、ゲー・ビー(Hillis, B.M.), ケー・ワローナ、ニフ・ユエ(E. Palazzi, P.J.), ノンツ・イン・エンザイモロジー(Methods in Enzymology) (1983) 133, 233~260頁、及びライシュニク、エル・ユエ(Hrischall, E.A.)、著Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79, 529~542頁、を参照)。エンゲルケ、ディー・アール(Engelke, D.), 以下は、オリジナルのプライマーの一方に入れ子になっている、1つの新しいプライマーのみが、鎖的DNAのより大きくかつより一貫した増幅をもたらすことができることを示している(Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1985) 82, 541~544頁)。

本発明者は、本発明の結合したオリゴヌクレオチドを有する鎖鎖がPCR増幅法におけるプライマーの1つとして使用できることを発見した。この反応の増幅は増幅中で見られるものに近い。入れ子になった第2のプライマーが使用される場合、本発明の鎖鎖は第2のPCR鎖において使用することのみが要求される。各々の場合、増幅された全てのDNAは鎖鎖態に不動態化され、鎖鎖の反応を促進するために容易に溶解できる。増幅されたDNAが鎖鎖に存在するように、鎖鎖とオリゴヌクレオチドプローブ/プライマーの間に対応又はその他の可逆的結合を設けるのが好ましい。

デオキシリボース/プライマーを使用するPCRを行うこともでき、また鎖鎖DNAを増幅するためにアビタン又はヌクレオチドアビタンで被覆された本発明の鎖鎖態を使用することもできる。

4. 鎖鎖DNAのラベル付けとその分析

英國特許出願第 1127166, 1号に対応する本願と同日付けの本願出願入による国際特許出願であって、その内容が参考として本明細書中に組み入れられているもの、には、鎖鎖態にラベル付けする方法であって、鎖鎖態の公知の配列に特異的なオリゴヌクレオチドプローブを結合した鎖鎖態を鎖鎖態を含む混合物に溶解し、プローブをプライマーとしてポリメラーゼ及び遊離な塩基とともに使用して多数のラベル付けされたヌクレオチド塩基を組み入れたDNAを合成する方法が記載されている。この方法は特に簡単で迅速であり、鎖鎖態を定量的又は定性的に分析するのに使用できる。

5. DNAの合成

英國特許出願第 1127166, 1号及び第 1127166, 2号に対応する本願と同日付けの本願出願入による国際特許出願であって、その内容が参考として本明細書中に組み入れられているもの、には、オリゴヌクレオチドプローブを結合した鎖鎖態を鎖鎖態に知してハイブリッド化させ、プローブをプライマーとしてポリメラーゼ及び遊離なヌクレオチド塩基とともに使用して、

<p> 附录 4-50: 1959 (10) </p>	<p> 附录 4-50: 1959 (10) </p>
---	---

cDNA鎖を会合させることによる、cDNAの会合が阻害されている。この方法に、個々のcDNA分子を会合するために、更体溶液から特定の糖の糖鎖の全てを剥ぎ取りRNA中の全て、に所留するcDNAを製造するために適用できる。

6. 本説明の毒性試子を使用する方等のための注意

本説明はまた本発明の万法を實施するためのキットを提供する。

A. サンプル中の全てのMRNAを阻害するためのキット

- (a) オリゴ・17 を指標した本報題による導性分子の
 ϕ 1 つ以上の
- (b) ハイブリッド化炭素網
- (c) 炭素用膜電極

8. サンプルから特定のmRNA又はssDNAを単
調するにのめット

- (a) 特定のオリゴヌクレオチドを担持した不溶材による固相粒子及び1つ以上の
- (b) ハイブリッド化緩衝液
- (c) 洗剤用緩衝液

C. DNA又はRNA経基配列決定用のキット

- (a) オリゴ- β または特種オリゴ糖架橋剤を用いた本発明による調味料
(b) オリゴ糖及び1つ以上の
ii) 調味料成分

のアミノ基特性和比較して、アルキルリンカーの末端部1アミノ基のより大きな求核性をもたらし、従って、極点上のカルボキシル基にこれらの第1アミノ基と優先的に反応することが予想された。

1188カルボキシル錯子に相当たり、0.17イミダゾール基を脱離し、0.1 M HCl の400 ml 中の150 ml 3'-HMI 溶液ブローを添加した。反応混合物を微やかに撹拌しながら室温で2時間置いた。

(b) 卵、培養ブローチをアプライド・バイオレステム・レンササイザー (Applied Biosystem Spectrophotometer) とアミノリンク (Aminolink) 互を併用して製造した。
カップリング反応は以下の通りであった。

3.3.3.3 カルボキシル基平均1個当たり、0.1 M イミダゾール緩衝液(pH 7.0) (50 μg 5'-HIS改質プロベ、0.1 M EDC を添加した、反応混合物をロータリーサイナー [コールター (Coulter)] 上、室温で20時間待ち、その後、0.1 M HCl (4%) を含む緩衝液中で洗浄した。

ハイブリッド厚紙 (ハイブリダイザーシート) 特許。

素々の量の混合したブローブを有するある断面の位相を補正例 11 or 12 のブローブを用いてハイブリッド形成装置において試験した。

電子は、粒子1個当たり1~300 p.u. の結合したブローブをカバーしていた。

34 第 4 章 ポリイオン系エレクトロリットの電位を除去に効果的

- [4] シデオキシヌタレオキド (ET, 101, 100, 及
105)

- 115) リデオヤシヨタレオサド、デオヤシヨタレオサ
ド、又はサリギエタレオサドであつて、各々ラベ
ルを担持しているか又は指示するように適合され
ているもの。

カ、ポリメラーゼ連鎖反応(PCR)用キット

- (1) 磁気検波の1次元用と標準的特異的DINアップ
ロープ／ブライザーを拒絶した本発明による磁気
磁子；
- (2) 前述によりタペル付与された標準的1D1'グループ
ライマー；
- (3) 異常定数水リノレーズ；及び1つ以上の
- (4) 適当な顕微鏡；及び
- (5) 制御ユニットとレーズ。

以下の実施例は説明のためのみに与えられている。

圖 3-1-2 (a)

ホルミクシミド(201)で紹介された β -Hxプロープの
ホルミキシル塩子への結合

- (5) プロープのアルギニル残基への結合に使用される反応は以下の通りである。チュウ (Chu) 氏によって記載された [Chu, Y. C. P. 及びオーゲル (Ogert, L. E.), (1965) *BBA* 4, 152 ~ 161]、1. 糖基転移を媒介してプロープの1'-蔗糖基に導入されたアミノ糖は、糖基

あきながら、徐々に増加する量の結合したブロープとハイブリッド形成させた。100 mol%が、結合した100 poolを有する粒子に対してハイブリッド形成した。しかしながら、薬的分子が100%の濃度になった場合(対照: 0 RDT、プロメガ、コーポレーション[Prepact Corporation])、結合したブロープを100 poolを有する粒子とより密度が高かったブリンドした粒子とを比較してもハイブリッド形成効率が低下はなかった。

五、應收帳款

カネボウが「下宿」で仲介した「F・ホスフェート」
 プローブの「アミノ酸」への反応

ゴーストによって脱脂された方糖「ゴースト・エス・エス (Ghost, 9.0)」及びメッゾ・サー・エフ (Mezzo, 6.7)、(1993) Real Acid Ice, It, 5385~5392) によって、ブローブのホスホリアルアミド結合を介して二糖の異なるアミノ糖子に結合させた。これらの異なる糖子に結合したDHAの数は、1.1 ~ 11.6 マイクログラム/粒であった。

ポリエチレングリコールリンカー（ β 原子）の末端にアミノ基を担持する R499 単位は、より短いリンカー（ β 原子）上にアミノ基を担持する R248 単位よりも多量のブローブと結合する。2448 単位のようにリンカーをもっと長くすると α 原子の数（20）、単位に結合するブローブの量の減少が観察される。これはおそらくリンカーの二重構造によるものであり、これが末端アミノ基をサブ

將表平4-501958 (11)

F-111プロープのトシル基熱化脱離へのカップリング

アブライド・バイオシステム・DNAセンサー
III とアミノリング II を使用して、R1: 番をオリゴヌ
クレオチドの4'末端に導入し、1'末端に第1R2: 番を導
入した。アミノリング II はアブライド・バイオシステム
社から供給される。合成後これらのアミノ環状オリゴ
ヌクレオチドを直接カブリング反応に使用された。

トシル基(=SO₂)は、オスロダイナル(Oslo)から印刷されている。

キャブリング手順:

10 mg のトシル酸化性種子を、100 μ l の 0.5 M $\text{Bu}_4\text{F}^+\text{PF}_6^-$ 中、 120°C に加熱オリゴメタセオチドと重合し、ローラーミキサー（コルター）上で7分間で10時間待ち、その後 0.1 M HCl (1%) を含む200 ml 溶液中で洗浄した。

实例例 1

直靜合球

ダイナビーズ R111 磁子を使用した。これは、直径が 1.1 ミリメートルで厚さ 0.15 ミリメートルであることを除いて R-210 磁子と同じであり、R-210 磁子と同様に表面には第 1-0H 線を含んでいる。

合成画 (フォーマット・シーン・デレンダラ (Format Scene Renderer)) を使用して、D 組入の駅東端を真面に折合せた。

3. 15 Å の粒子に適合させるために種々まい変換が必要であった。アブライド・バイオシステム社からの

リングに相同でなく下五等である。

非特同時に結合したR'の量は、おそらく単位重量当たりのアミノ基の数によって、ほぼ等である(7-14%)。I(糖基は最も多くのアローブと共有的に結合するが(1; 4.10))、これは最も低い非特異的結合しか示さない。

ネスホルアミダー」結合の環不飽和基〔 $\text{CH}=\text{CH}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2$ 〕、パーラ ジーニム (Pall. G.V.)、及びベージェル エル・イー (Begel E.E.), Pall. G.V. No. 11、(8512~8529) は、酸触媒分解によって末端結合の位置を固定するのに使用される。末端結合グループの置換、異なる原子間で11~8529まで高化し、更に、8530数字が67%の濃縮重合したアロップを有して有り得るというのである。

本実験者らは、128、室温で1時間の代わりに、117の塩化銅中に於いて3時間反応を行うことによって、128の位子に残留のブロープ量を割合させることができた。128のモル数に0.1モルから1.1モルまで増減させると、128位子上のブロープの量が20%減少した(データは添えられている)。

一般的方法

400 mg (6.4 g) のポリゴ A (14.8 g) を、1 ml の 1,1,1-トリクロロエタン、107、0.1 ml 10% に溶解させ、5 ml のアミノ酸と混合し、10℃で2時間反応させた。

五、協同問題

標準的小スケールカラム中、トリミダロンでカットオフするデフロンフィルターを固け、粒子を投入し、そしてカラムを固め立てた。

この招待体はジメチルトリチル DMTH 蓋を介して得られ、最初のサイクルの最初の工程でこのような化学物質が運送しない場合装置が停止するので、図 6 手順に小さい改良を導出した。DMTH 蓋が運送する直前最初の 10 小セルコラムを使用して合流を形成した。その後、ゾーン・アンプレータを手動で停止し、炭酸ガスを含む低圧カラムをゾーン・アンプレータに入れた。その後、装置の製造業者によって作成されている標準的合流プログラムに従った。デプロテクション (deprotection) がファーマシアから提供された。炭酸ガスを含むオキサリド (oxalid) およびカルバマゼピン (carbamazepine) 塩溶液の 0.05 塩から以下の配列を製造するために使用した。

1'-TCAATGCGATTGGTGGGAAAGGCTGCAATACAACTTCCTGCG-3'

送周朝野

材料与方法

濕性粒子

ダイナビーズ M-880 ストレプトアビジン (ダイナル
L. S. , 0.1% 1.0% , P-8812 オスロ) を固相担体として使
用した。これらは、 8×10^6 の菌数を育しており、スト
レプトアビジンと共付着している単位量は常規性ポリ
マー担体である。これらは 1.5×10^3 /g の表面積を有して
いた。

ビニラン結合能力

1 mol の ^{14}C -ピオチン [アークシム (Aerobius)] を含む 100 μl の 10% (ホスファートと BSA を有する無機塩の塩類: マニテース) を 0.5 ml の粒子 (0.1 μm の SiO_2 の粒子) に吸着し、室温で 15 分間ローラ-ミキサー (コルター) に入れた。

6 x 1671で2回焼淨した後、シンチレーション計測
によって特異した¹⁴C-ビオチンの割合を測定した。

ゴッホの肖像は、ゴッホの肖像

アブライド・バイオシステム・§113 DNAシンセサイザー上でデオキシオリゴヌクレオチドを合成した。

化学製品はアブライド・バイオシステム社から購入した。アミノリンタールを使用した、β-アミノ改質デオキシオリゴヌクレオチドを製造した。

使用した炭素ガラス管キャパシタの値は、
 $C = 1.64760 \times 10^{-6} \text{ F}$ であり、
 であった。

ヨーロッパの工業製品

原料等によって提供されたように、ジオタン 388 エステル [1,1-ジオカニルと、カブロン類のクロンテック (C141116) のイスタシイミジル] を使用した。

50 ml の水中の 0.1 mmol Vb₂ 溶液オリゴ(15)₂を 10 ml ラベル付の試管中に 1 ml ナトリウム緩衝液添加/試験液、pH 7.4 に添加し、検出した。

最後に、シメツルホルムアミド(2.15g)のジオチン

特表4-501959 (12)

1113 エステル (113 ag/a) を添加して室温で一晩保存した。

過剰のラベル付け剤と反応物を、セファダックス G8 スピンカラム (sephadex G8 spin column) 中で除去した。

Elisa のポリメラーゼ、 α -[³²P]-UTP、及びチンブレートとしてオリゴ (113) による反応中のフィル (111) を使用して、5' ビオチンオリゴ (113) を電気泳動ラベル付け (end labeling) した。過剰のラベル剤をセファダックス G8 スピンカラムを使用して除去した。

オリゴ (117) ダイナビーズ (T-ビーズ) の製造

2.5 ml 6 x 15PF 中の 21PF ビオチニル化オリゴ (117) (14 x 20) を、10 ml の予め洗浄したダイナビーズ E-10 ストレプトアビジンと混合し、室温で15分間ローター・シー上で保った。

6 x 15PF 中で2回洗浄した後、ビーズを6 x 15、1.1 M NaCl 中で4度で洗浄した。

オリゴヌクレオチドハイブリッド形成分析

T-ビーズの種々のバッチのハイブリッド形成能力を測定するための確率的分析において、エペンドルフ (ependorf) 管中の0.1 ml のビーズを 6 x 15PF、4.15 M NaCl で1回洗浄した。マダネットラック (MTC-8、ダイナル、6、オスロ) を真空状態に粒子を乾燥させるのに使用した。

洗浄用緩衝液の除去後、50 μ l のオリゴ (117) と塩量 (1 ~ 2 x 10⁻³ M) の α -[³²P]-dATP-ラベル付オリ

ゴ (117) を含むハイブリッド形成緩衝液 (4 x 15PF、0.1 M NaCl) を添加した。

管をふたを閉じた後、管を室温で2分間放置してハイブリッド形成させた。

ハイブリッド形成した粒子を室温で2 x 15PF、4.15 M NaCl を用いて2回洗浄し、オリゴ (117) に対してハイブリッド形成したオリゴ (117) のパーセントをシンチレーション計測器中で測定した。

ポリ (A) mR N A トレーサーのラベリング

2' ポリ (A) テールを有する 1 x 10⁶ bp mR N A (プロモダ) を、10 μ l 5 x 10³ M 緩衝液、1 U 2' アシン (Klenow)、15 mM 10³ 中の 2.5 mM オリゴ (117) と混合した。室温で2分間、10 mM α -[³²P]-dATP、1 U Klenow ポリメラーゼ (アマーシャム) 及び 50 μ l までの水を添加し、15℃で15分間反応を続けた。過剰の α -[³²P]-dATP をセファダックス スピンカラムを使用して除去した。

オリゴ (117) と混合したダイナビーズ E-10 ストレプトアビジンに対するポリ (A) mR N A ハイブリッド形成試験成績

ポリ (A) 結合緩衝液:

0.5 M NaCl、10 mM Tris-HCl、pH 7.5、1 mM EDTA、

0.1 mM 2-メルカプトエタノール。

中間洗浄緩衝液:

0.15 M LiCl、10 mM Tris-HCl、pH 7.5、1 mM EDTA、

0.1 mM 2-メルカプトエタノール。

抽出緩衝液 1 mM EDTA、4.1 M NaCl。精製 mR N A のその他の用途に応じて、最後の洗浄工程と抽出緩衝液中の EDT を省略できる。

全 R N A の抽出

細胞系培養からの全 R N A の抽出は、オーフレイ (Offrey) とロージョン (Rigdon) のプロトコル (1980, Exp. Cell Res. 121, 313 ~ 314) に従って、サルコシル (sarkosyl) 法、15℃、緩衝液を使用して行った。

R N A のカップリングとハイブリッド形成能力

本願の実験において使用したダイナビーズ E-10 ストレプトアビジンは、粒子 10³ 当たり 14 pmol の 5' C-ビオチンに結合したことが判明した。

結合した 5' ビオチニル化オリゴ (117) の量は、カップリング反応中にラベル付けしたトレーサーを使用して測定し、粒子 10³ 当たり 21 pmol の ビオチンオリゴ (117) であることが判明した。

これらの特性オリゴ (117) 粒子の最大ハイブリッド形成能力を決定するために、材料と方法において記載したような (117) オリゴヌクレオチドを使用して分析を測定した。

本願の研究において測定し使用した T-ビーズのバッチは、100 pmol オリゴ (117) のハイブリッド形成能力を有していることが判明した。

非特異的結合を測定するための対照実験において、非特異的アローブ (117) (117 アローブ) とカップリングした粒子は、粒子 10³ 当たり 10 pmol オリゴ (117) 未満しか結合しなかった。

オリゴヌクレオチドとのハイブリッド形成速度論

随機的に mR N A 単離実験を開始する前に、この系のハイブリッド形成速度論を研究することが必要であった。

種々のオリゴ (117) 種々のヌクレオチドに対して各種測定装置の T-ビーズハイブリッド形成能力を使用して、ハイブリッド形成速度を測定した。

第1図が示すように、ハイブリッド形成は1分以内に完了した。

オリゴヌクレオチドとのハイブリッド形成速度

どの程度速率的に特異的結合が結合から分離できるかを試験するために、本発明者は2つの異なる実験を組み立てた。

第1の実験においては、徐々に量を増やしながら持つかの量の種々のオリゴヌクレオチド (オリゴ (117)) を、公知の最大ハイブリッド形成能力 (100 pmol) を有する固定量 (100 μ l) の T-ビーズに結合した。第2図中の図解は、種々の T-ビーズ能力の比率が 1 : 1 に近づいた場合で、T-ビーズは少なくとも19回の種々のオリゴヌクレオチドと結合できることを示している。

第2の実験において、1 pmol から 100 pmol までの5つの異なる濃度のオリゴ (117) を 100 μ l の粒子の

発表年4-501959 (13)

7-ビーズに結合するポリA-mRNAのハイブリッド形成の温度依存性

オーフレームの上述の方法を使用して、ハイブリドーマ細胞系 (1er) (81(1)) の 1×10^6 細胞から全RNAを抽出した。オリゴ(41)種子に対するmRNAハイブリッド形成の温度依存性、10Mの全RNAを重量の70%-ラベル付けされたマウスの脾臓ポリA-mRNAとともに、そして150 μ lのハイブリッド形成緩衝液中の約5%濃度の7-ビーズ結力を使用して、測定した。第8図中の行番号、サンプル中のポリA-mRNAの10%濃度が2分以内にビーズに対してハイブリッド形成し、また14秒後には10%が既にハイブリッド形成していることを示している。

細胞質 (cell) (199) からのポリA-mRNAの高度純度の取得

ハイブリドーマ細胞系 311の培養液からの 10^6 細胞を1度洗浄し、100 μ l 75% (ドゥルベッコ (Dulbecco), 81-04110) 中に再分散させ、トリトン (Triton) X-100 を0.5%の最終濃度まで添加した。1分間のリンス (1114) の後、細胞を含む緩衝液を、ニッペンドープ (Nipendrop) 遠心分離機中で10秒間スピンさせてペレット化した。上澄液を、2時間後の100 μ lハイブリッド形成緩衝液中の7-ビーズに添加し、2分間放置してハイブリッド形成させ、その後種子を磁気的に分離させた。ハイブリッド形成したmRNAを2 \times 500 μ l 15°Cで種子から切り離し、種子を磁石を使用して除去した。この

アリコートに添加した。各混合液中に存在する標識の全量を、放射能のオリゴヌクレオチドを含むプローブで10 poolまで薄めた。放射能オリゴヌクレオチドを含むない特定の対照実験においては、非特異的結合を決定できるように、非特異的プローブをラベル付した。2分間のハイブリッド形成後、2段階の洗浄工程を行い、ハイブリッド形成したオリゴ(41)の量を測定した。第9図中の結果は、100 poolのような低い標識オリゴヌクレオチド量 (存在する全標識の1.11%) でも、遺伝オリゴ(41)種子は95%以上を引き出すことを示した。

ポリA-mRNAの結合的親和性

(11) 5μ gダイナビーズ結合ポリA-mRNAの結力、脂質、および脂質結力、オリゴヌクレオチドハイブリッド形成に關して既述したような親和性の1級の実験を組合立てることによって実施した。

7-ビーズの最大ポリA-mRNA結合結力を決定するために、1'末端に30 μ gを有する1000 μ gオリゴヌクレオチドのオマイシン転写 (プロモガ) である全細胞の粗製の70%-ラベル付けされたポリA-mRNAを使用した。結合結力を決定するための方法は、オリゴヌクレオチド結合分析に關して既述したのと同様であるが、上述のハイブリッド形成緩衝液を適用した。

この特定のポリA-mRNAの結合結力は、7-ビーズ1 μ gあたり100 (132) のmRNAであることが判明した。

実験においては、 10^6 ハイブリドーマ細胞のアリコートを、可溶性、500 μ l、100 μ l、50 μ l、20 μ g、の7-ビーズと、プローブなしの141 μ lのダイナビーズ 1001-ストレプトアビジンに添加した。7-ビーズから切り出した後、ポリmRNAのノーチンブロッグ (Nottin block) からのヌクレofilムをデソントマーでスクリーンし、免疫グロブリンキャパシタプローブで添加した。これらの結果は、mRNAの収量がビーズの量が増加するとともに増加し、一方上澄液中の総mRNAがそれに相対して減少することを示している。第4図中に既述されている結果は、約130 μ gの7-ビーズが 10^6 細胞からの細胞質ポリA-mRNAの10%より多くを分離するのに十分であることを示している。図中の記号-△は種子に対するハイブリッド形成を、記号-○は上澄液中に残留しているmRNAを表す。プローブを有していないストレプトアビジン種子は検知可能なmRNA結合を与えなかった。

産物例2細胞質-細胞系「ラサ (111)」 (ユウエーデン、ストッホルムのロー・アイン教授 (11) 2 (111)) から抽出されたmRNAの精製

オーフレームによって (ex. 1, Black 111, 201 ~ 210 (111)) に記載されている方法によって、 1×10^6 細胞から全RNAを抽出した。この方法に従って、0.1 μ lの細胞ペレットを、3 μ l 氷冷分液 (111) 緩衝液 (3

111) 、5 μ l 緩衝液、0.1 μ gサルコシル (112011)、0.1 μ g 2-メルカプトエタノール、5 μ l トリス-HCl、pH 7.5、5 μ g EDTA) に添加した。その後、混合物を超音波処理し、氷上で一晩保持した。

翌日、分液液を11.000 μ lで30分間遠心分離した。ペレットを速やかに75-80°C (111) 2 \times 500 μ l、0.5 μ g EDTA) に添加する。同様のフェノール-クロロホルム (1:1) で1回抽出し、その後クロロホルムのみでもう1回抽出した。分液液を3倍体積のエタノール (111) 体積の3 \times 100 μ lと混合し、100 μ lパッチに分離し、そして使用するまで-20°Cで保存した。

1×10^6 細胞に相当する全RNAのパッチの1つに、マニタリスによって (111) 2 (111) に記載された方法に従って、オメガ (Omega) 7-セルローラを使用する従来のmRNA精製法を施した。

全RNAのもう1つのパッチを以下のmRNA精製方法に於いて使用した。

DNA合成装置 (アプライド・バイオシステムズ製) によって製造された、第5代 (H4) (H4) 11-045077000175 CCGGGGCTGGAT- (11) μ gを有するP81と命名されているDNAプローブを、11 μ gのP302種子、11 μ gの遺伝DNAプローブ、1 μ lの0.1 M イミダゾール緩衝液 (11) 1.0 中の10 μ gのEDC/シデマ製と混合することによって、(前述の) カルボジイミド法によって磁気種子P81に結合させた。一晩反応し、15 (上述のもの) で2回反

特表手4-501959 (14)

チドを睡気した。

而且 N A 作製實驗は以下のように行った。

RTA プロセスを有する粒子 1 個を、 $161 \mu\text{m}$ の SiO_2 膜中に $100, 400, 1 \mu\text{m}$ のトレース- SiO_2 膜とともに、 200°C の熱処理から室温までの温度範囲に露光した。

同じ実験を行ったが、原子は1e-プローブを有していた。

ハイブリッド形成は型皿でローラーマシン (Roller Machine) 上で行った。ハイブリッド形成反応の後、短い間隔で、岩石によって粒子を減量させ、上置液中の残留放射能を測定した。各測定の後、粒子をすぐに再分散させた。

10分後、 $\pi R N A$ の50%がE1 プローブを有する粒子に結合した。対照粒子は検出可能な量の $\pi R N A$ に結合しなかった。

10分間の保持後、粒子を直線で511 μ l 2 x 33Cで2回洗浄し、144 μ l 1F-炭型液中で充分触きせ、酸手を調整させ、上澄液を回収し、-10℃で凍結した。

例題 7

本発明の方法を、本発明者らの新装置でクロン化したりシン(1110)入増延子の1/4増延の出産配列決定を行うために使用した。

Fig. 1 断片上のラシンを $\text{pH} 5.0$ でクローム化した。この塩基子の pH 範囲は以前に記述されている。プラスミド $\text{pH} 4.0$ を $\text{pH} 5.0$ に用いて切断し、

予を脱出し、 0.2×10^{18} 、 0.4×10^{18} cm⁻³で1回凍結して8 passのオサゴム・プロセスをハイブリッド形成させる能力を与えた。 0.4×10^{18} cm⁻³の n -プロセス(キナーズ(Kinney)反応によって ^{238}Pu でラベル付けされている)も 0.4×10^{18} cm⁻³中で10分間保持することによって、ハイブリッド形成能力を顕示した。 ^{238}Pu でラベルよりも低い n -プロセス間位子を含持した n -プロセスの割合、全核密度に対するハイブリッド形成した n -プロセスの割合をシンチレーション計測機で測定した。

用 R N 人権の爲の対原物として、配列

$\text{HN}_2-(\text{C}_6\text{H}_4)_2-5'\text{-HN}_2-(\text{CH}_2)_4-\text{YAAATATCCAGTAAAGCTTCTGT}$
 $\text{TGGCTTTTGGGGTGAAGGAAAAAC-3'}$ を有した糸通されて
 いる無間隔のプローブを上述の方法によって被子和融合
 させた。

ラジ [Brij] m R N A トレーサーを 0.1 ml を加えて取
制液をバブル付することによって調製し、m R N A を上
述の能率増によって精製した。バブル付は、10 ml 5
% fatty ポリメラーゼ緩衝液 (0.05 M KCl, 0.05 M
TrisCl, pH 7.5, 5 mM DTT) 中 15℃ で 15 分間、1
mol の PEG-ブローブを m R N A に対してハイブリッド
形成させることによって行った。j6 x 6 i d - 127 H d A T P
(アマージム)、2 塩位の 12.5% ポリメラーゼを (BRL)
もこの混合剤に添加し、これを 50 μl で水で希釈した。
2 時間凍結した後、混合物をセファデックス 55
(ファーマシア) に絡めて組み立てられた 4 x グレシ

1) 1990年ロシア連邦を襲撃して、存在する唯一のタタリ
オラッドとしてのビヤチン(1937)でビヤチンル化した「マ
ニヤチス、1918 ~ 1919年参戦のこと)。ビヤチンはbell
郡位においてのみ組み入れられる。例としてプライマール
公知の記号データに基づくものであり、E-TEA-KIT-GU
-11-100-110-0であった。

組み入れられなかったビオ-0077を除去するために、0-11セファデックススピンカラムを使用して材料を精製し(マニヤクス181頁)、エタノールで析出させた(エタノールによる析出はあまりに苛酷である)。ビオチニル化された二重鎖DNAを含む混合物を、PE緩衝液(10 mM トリスHCl及び1 mM EDTA, pH 8.0)中のストレプトアビジン/アビジン緩衝液を柱より、逆相で34分間緩やかに洗脱(libration)させて、提示した。15kVの電圧(15%電圧/分)当たり2500のビオチニル化DNAを使用した。

結合したヒスチン化二重鎖DNAを15M NaCl中塩析で分離し、質をさせた。一重鎖DNAを析する因子を塩析を使用して図示し、1%緩衝液中でも回収した。

肥料使用效果

配列は定数であり、イマールのローエーリングは：

2.1 の中: 留声/ハイブリッド形式 (100 00、トリ
ス) 1.0、1.0 00 00 (1.0 00)

1. 2. 3. 4. 5. 6. 7. 8. 9. 10. 11. 12. 13. 14. 15. 16. 17. 18. 19. 20. 21. 22. 23. 24. 25. 26. 27. 28. 29. 30. 31. 32. 33. 34. 35. 36. 37. 38. 39. 40. 41. 42. 43. 44. 45. 46. 47. 48. 49. 50. 51. 52. 53. 54. 55. 56. 57. 58. 59. 60. 61. 62. 63. 64. 65. 66. 67. 68. 69. 70. 71. 72. 73. 74. 75. 76. 77. 78. 79. 80. 81. 82. 83. 84. 85. 86. 87. 88. 89. 90. 91. 92. 93. 94. 95. 96. 97. 98. 99. 100. 101. 102. 103. 104. 105. 106. 107. 108. 109. 110. 111. 112. 113. 114. 115. 116. 117. 118. 119. 120. 121. 122. 123. 124. 125. 126. 127. 128. 129. 130. 131. 132. 133. 134. 135. 136. 137. 138. 139. 140. 141. 142. 143. 144. 145. 146. 147. 148. 149. 150. 151. 152. 153. 154. 155. 156. 157. 158. 159. 160. 161. 162. 163. 164. 165. 166. 167. 168. 169. 170. 171. 172. 173. 174. 175. 176. 177. 178. 179. 180. 181. 182. 183. 184. 185. 186. 187. 188. 189. 190. 191. 192. 193. 194. 195. 196. 197. 198. 199. 200. 201. 202. 203. 204. 205. 206. 207. 208. 209. 210. 211. 212. 213. 214. 215. 216. 217. 218. 219. 220. 221. 222. 223. 224. 225. 226. 227. 228. 229. 230. 231. 232. 233. 234. 235. 236. 237. 238. 239. 240. 241. 242. 243. 244. 245. 246. 247. 248. 249. 250. 251. 252. 253. 254. 255. 256. 257. 258. 259. 260. 261. 262. 263. 264. 265. 266. 267. 268. 269. 270. 271. 272. 273. 274. 275. 276. 277. 278. 279. 280. 281. 282. 283. 284. 285. 286. 287. 288. 289. 290. 291. 292. 293. 294. 295. 296. 297. 298. 299. 300. 301. 302. 303. 304. 305. 306. 307. 308. 309. 310. 311. 312. 313. 314. 315. 316. 317. 318. 319. 320. 321. 322. 323. 324. 325. 326. 327. 328. 329. 330. 331. 332. 333. 334. 335. 336. 337. 338. 339. 340. 341. 342. 343. 344. 345. 346. 347. 348. 349. 350. 351. 352. 353. 354. 355. 356. 357. 358. 359. 360. 361. 362. 363. 364. 365. 366. 367. 368. 369. 370. 371. 372. 373. 374. 375. 376. 377. 378. 379. 380. 381. 382. 383. 384. 385. 386. 387. 388. 389. 390. 391. 392. 393. 394. 395. 396. 397. 398. 399. 400. 401. 402. 403. 404. 405. 406. 407. 408. 409. 410. 411. 412. 413. 414. 415. 416. 417. 418. 419. 420. 421. 422. 423. 424. 425. 426. 427. 428. 429. 430. 431. 432. 433. 434. 435. 436. 437. 438. 439. 440. 441. 442. 443. 444. 445. 446. 447. 448. 449. 450. 451. 452. 453. 454. 455. 456. 457. 458. 459. 460. 461. 462. 463. 464. 465. 466. 467. 468. 469. 470. 471. 472. 473. 474. 475. 476. 477. 478. 479. 480. 481. 482. 483. 484. 485. 486. 487. 488. 489. 490. 491. 492. 493. 494. 495. 496. 497. 498. 499. 500. 501. 502. 503. 504. 505. 506. 507. 508. 509. 510. 511. 512. 513. 514. 515. 516. 517. 518. 519. 520. 521. 522. 523. 524. 525. 526. 527. 528. 529. 530. 531. 532. 533. 534. 535. 536. 537. 538. 539. 540. 541. 542. 543. 544. 545. 546. 547. 548. 549. 550. 551. 552. 553. 554. 555. 556. 557. 558. 559. 560. 561. 562. 563. 564. 565. 566. 567. 568. 569. 570. 571. 572. 573. 574. 575. 576. 577. 578. 579. 580. 581. 582. 583. 584. 585. 586. 587. 588. 589. 590. 591. 592. 593. 594. 595. 596. 597. 598. 599. 600. 601. 602. 603. 604. 605. 606. 607. 608. 609. 610. 611. 612. 613. 614. 615. 616. 617. 618. 619. 620. 621. 622. 623. 624. 625. 626. 627. 628. 629. 630. 631. 632. 633. 634. 635. 636. 637. 638. 639. 640. 641. 642. 643. 644. 645. 646. 647. 648. 649. 650. 651. 652. 653. 654. 655. 656. 657. 658. 659. 660. 661. 662. 663. 664. 665. 666. 667. 668. 669. 670. 671. 672. 673. 674. 675. 676. 677. 678. 679. 680. 681. 682. 683. 684. 685. 686. 687. 688. 689. 690. 691. 692. 693. 694. 695. 696. 697. 698. 699. 700. 701. 702. 703. 704. 705. 706. 707. 708. 709. 710. 711. 712. 713. 714. 715. 716. 717. 718. 719. 720. 721. 722. 723. 724. 725. 726. 727. 728. 729. 730. 731. 732. 733. 734. 735. 736. 737. 738. 739. 740. 741. 742. 743. 744. 745. 746. 747. 748. 749. 750. 751. 752. 753. 754. 755. 756. 757. 758. 759. 760. 761. 762. 763. 764. 765. 766. 767. 768. 769. 770. 771. 772. 773. 774. 775. 776. 777. 778. 779. 780. 781. 782. 783. 784. 785. 786. 787. 788. 789. 790. 791. 792. 793. 794. 795. 796. 797. 798. 799. 800. 801. 802. 803. 804. 805. 806. 807. 808. 809. 810. 811. 812. 813. 814. 815. 816. 817. 818. 819. 820. 821. 822. 823. 824. 825. 826. 827. 828. 829. 830. 831. 832. 833. 834. 835. 836. 837. 838. 839. 840. 841.

1.4.2.1 鹽糖水

を含む混合物を粒子に添加し、51℃で5分間保持し、その後ゆっくりと室温まで冷却した。

アニールした粒子ゲルプレート-ブライマーに以下のものを添加した。

10/1/99 ddtPd\$ 1.6 m l 247.241, 651 (1/m ncl)

Renew L.D. # 1 (4 Pgs)

b6
b7C

22 を代わり可以使用である。

金属化合物を、A、G、C、及びアとラベル付けされた、4つのマイクロ遠心分析チューブ又はマイクロ測定プレート中の液体相に（ケルル¹）に分配した。即ち、（粒子の体積のために）各々4μlずつに分けた。

4 ユーの適切なヌクレオチドを各チューブ/ウエル混合液、即ち、A ミックス (a5s)、C ミックス、G ミックス、及び T ミックスに添加した。

А Б В Г Д Е Ж З И Й К Л М Н О П Р С Т У Ф Х Ц Ч Ш Щ Ъ Ы Ь Э Ю Я

100-~~4~~-~~7~~ dsnTP

Q主成分: 5重量部PTP、10重量部PTP、10重量部PTP、10重量部PTP

C 三、四又：106山第 457P、477P | 19年 407P 風止

ИДЕЯ И ДИСТ

トニヤダス: 100 μH 0.57P, 1 μH 0.57P, 100 μH.

457P 28 28 30000 0 4077P

混合物を蒸留で15分間取回して保った。

2.1 増幅テンプレートを担持する固体相 DNA 塩基配列
 決定

マルチーリンカー順環の上流領域 (5'-CATGATACCAAGTTTAAAG-3') 及び下流領域 (5'-TTCCATATCCGCTACCCAGACACCGCATGATGATCCG-3') のそれぞれに塩基特異的かつ可逆的グアニネオキシドプライマーを適用してPCRを行った。図1右が「スウェーデンのファーマシア (Pharmacia)」が配製しているように上流プライマーを5'末端においてデオキシリル化した。

リデオキシシクロオキソドで染み取っていない全ての
層の完全な溶解を、11.5μlの各シクロオキソドを各の8
μlのデオキシシクロオキソドで溶解、0.1%を添加し、
15分間を要して溶解することによって得た。

5 mL のホルムアミド溶液を添加し、余剰水中で充分
 顔料脱して、塩析からのラベル付けされた DNA を定
 性することによって、反応を停止させた。その後、塩
 子テンプレートを塩析的に分離し、ラベル付けされた
 DNA を含む $50 \mu\text{L}$ の上清液を鏡面反射分光測定用ブ
 ール (birefringent base - verdant cell) : アーシェ
 ム (Aeschek) からのプロトコル (protocol) に入れた。

テンプレートを用意するだけで洗剤液を再使用でき、印刷
配列調整などの原列決定作業は従って新しいプライマー
用になる。

最初のプレイヤーは全知の配列データ、即ち、 $61-701-1117-9061-21-621-1116-2'$ に基づいた。

2つの次のプライマーは、この実験からの以下の配列データに基づいた:

7762-2 \$-E. J. G. A. 100-457-408-478-0-2

ブライマーズ 31-6611 / TEL: 641-6411-7466・46・37

これら3つのプライマーを使用することによって、リジンを溶媒中での濃縮の1/10の濃度の範囲投与が可能であった。

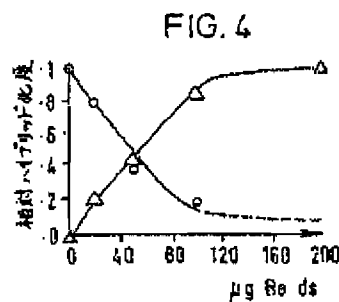
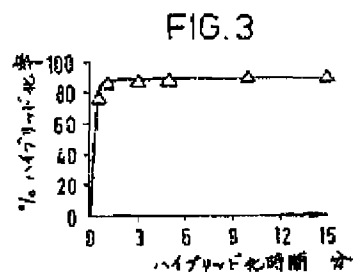
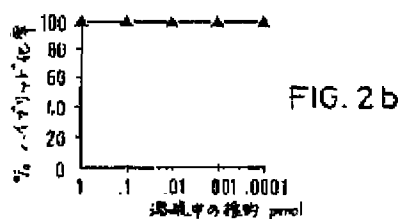
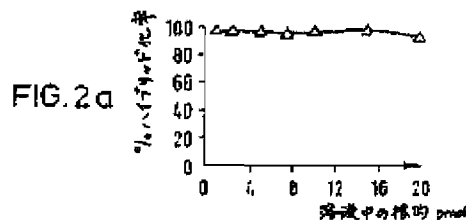
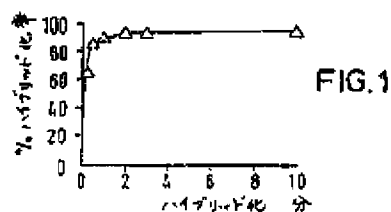
対照として、 μ を用いて同じ条件下の配列検定を行った。同じ結果が得られた。

[illegible]

マシラーマンカー試験からまず下位の領域に特徴的の、果糖を配列する付された配列決定プライマー (1'-GGTGGTAAAGGCGTGGG 3') を使用して、反復座標位置を行った。2' end の配列決定用プライマーは位置に不適合なされたタンブロー (1'-NAGG, 1'-GGGCTGTCAG-3') (GATC, 1'-GGGAGGCG, 2'-AGGAGGAGGAGGAGGAGG) の配列を引いた。5'端位置まで各の複製液中で選別した。ヌーアリング複製歩 65℃ で 4 時間、高塩濃度で洗浄された。5'端の GATC/GAATC 領域 (1'-GGGAGGAGGAGGAGGAGG) の GATC 及び G 塩基が T に置き換えられ、プライマーを合成し、ヌーアリング複製歩 65℃ で 4 時間、高塩濃度で洗浄された。

ケルマデーン) を添加し、体系を 15 ml に調整した。その後、この懸濁液の 3.5 ml のアリコートを作り、1 ml の基質溶液より「重合物と混和し、30 分で 1 時間保持した。以下のヨウ化ナトリウム試薬を使用した: 20 mM 延の GTP, dCTP, dGTP, dTTP, 1.1 mM の無水 ATP、50 mM の NaCl、及び 10 mM のトリス-HCl pH 7.5。伸張 (stretching) 反応の完了後、各反応の上澄液を除去し、スプレッドアビジンアガロースを水で洗浄した。(14 mM NaCl, pH 7.5, 0.3% Triton X-100, 0.05% キンレンシオール (Tween 20)) 洗及び 0.5 M NaCl の 2 分間洗。スプレッドアビジン (Biospecific Biol) を希釈液で 10 分間洗。スプレッドアビジンから 50 mM NaCl で洗脱した。洗脱液を 100 mM NaCl で洗脱して、新しく合成されたオリゴヌクレオチドを洗脱させた。30 分で 1 時間保持した後、上澄液を除去し、3.5 ml の水で洗浄した。新合成オリゴ中の塩基のバンド確認するように決定した自動電泳法配列決定装置に送る前に水を加えた。30 分間乾燥、及び 1 時間よりアクリルアミドゲルによる配列決定領域が明確な結果を得た。この例は、PCR 増幅された DNA が電気泳動上には不動化せず、140 mM 塩化リチウム塩と塩酸ブチルアミンを用いて配列決定が可能なことを示している。

刑 庭 平 4-501959 (18)

[illegible]

| MEMORANDUM FOR THE RECORD | | |
|---------------------------|---|------------------------|
| TO: | FROM: | DATE: |
| 1 | DR. J. D. H. (JAMES H. D. H.)
7 September 1957
see the whole document | 1.8.57 |
| 1 | " | 2-7, 15, 20 |
| 2, 3 | DR. J. D. H. (JAMES H. D. H.)
18 May 1958
see the whole document | 2.8.58 |
| 3, 4 | " | 2-7, 15, 20 |
| 5 | DR. J. D. H. (JAMES H. D. H.)
7 September 1958
see the whole document, especially
pages 1-3, 20, 21; also 1-7
4 H. J. D. H. (JAMES H. D. H.)
10 October 1958 | 2.9.58 |
| 6 | " | 2-8, 25, 26,
30, 31 |
| 7 | Nuclear Acid Research, vol. 15, no. 7,
1958, 181 pages limited, Oxford,
O.U.
S. J. D. H. et al.: "Field phase DNA
sequencing using the blotting-
technique"
pages 1035-1038,
see the whole article, especially
page 1037, paragraph 1 | 2-11, 27-29 |
| 8 | DR. J. D. H. (JAMES H. D. H.)
7 August 1957
see the whole document | 2-11, 24, 25 |
| 9 | " | " |
| 10 | DR. J. D. H. (JAMES H. D. H.)
7 June 1957
see the whole document | 2.17.57 |

75 庚午 4. 501353 (97)

| | | PCPNP 880102 |
|---|--|-----------------------|
| K | US, A. 6302074 (FARMACIALE AG)
30 June 1948
See pages 4, 7; column 2, 4
.. | 1, 2-1 |
| A | US, A. 6552767 (HISTICAL)
30 March 1957
See abstract, columns 7, line 4 -
column 8, line 8
(added in the application)
.. | 1 |
| A | US, A. 6552767 (HISTICAL)
28 June 1957
See abstract, column 7, line 4 -
column 8, line 16, example 17
(added in the application)
.. | 1 |
| K | Chemical Abstracts, Vol. 168, No. 23,
June 1948, (Columbus, Ohio, US),
J. Tompkins et al.: "Formulation
applications of monomeric
monomers in polymerization"
see page 222 abstract 101622a
5 May 1948, Ser. 2 1957, 111
(Fusion Div., 2045, Columbia,
355-70)
.. | 1-8 |
| K | US, A. 6121994 (ADVANCED MATHEMATICS, INC.)
12 November 1954
see the above abstract, especially
page 12, lines 26-30
B DE, A. 4471849 (added in the application)
.. | 1, 2-13 |
| Y | | 2-7, 10-15,
18, 19 |
| F | US, A. 6300361 (COMEX CORP.)
10 December 1955
see abstract
.. | 16 |

| | | |
|------|---|------|
| Y | RE. A. 473621 (COLUMBIA UNIV.)
4 October 1958
New document; Section 5 | 12 |
| P, X | RE. A. 88-11546 (C. FAYLOR)
16 November 1958
see the whole document | 1-13 |
| T | RE. A. 88-09281 (M. COLLIER)
8 October 1959
see the whole document | 1-19 |

[illegible]

The present invention teaches the use of nonmodeling, superparametric particles associated with a plurality of suitable acid molecules in nonacidic reactions. For the subject matter to form a literary concept, it would be necessary that the general inventive concept as defined above not have been disclosed in the prior art. In this regard, the general problem underlying the invention is not novel and a solution to it has already been found in the state of art as illustrated by the cited art. This document teaches the use of superparametric particles associated with at least one nucleic acid probe molecule and which are capable of subsequent homogeneous distribution within a sample medium, the beads are spherical and generally have a diameter of one micron, see page 4, lines 35-44, and page 6, lines 7-10. By describing the particles as capable of substantial homogeneous dispersion, it is not explicitly described a dispersion whose properties are substantially uniform in nature, i.e., the dispersion comprises substantially similar or substantially identical particles or elements in accordance with the lexical usage of "substantially homogeneous." But US 2011-014 defines particles whose distribution properties fall within the scope of these defined words, the quantitative characteristics of which are not claimed. Indeed, in US 651276 and US 433177, both of which are incorporated in the application by reference and appended to the search report, the term "nonmodeling" is used loosely to describe particles having approximately the same size, for instance a standard deviation of less than 1% as in US 433177, column 8, lines 1-6, and in US 651276, example 1, line 64. The term "nonmodeling" is used for particles having a standard deviation of 10%. Therefore, the above solutions proposed for the problem previously here and resolved are longer and do not form a common inventive concept. The search has been restricted, as a result, to the first prior described.

